

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

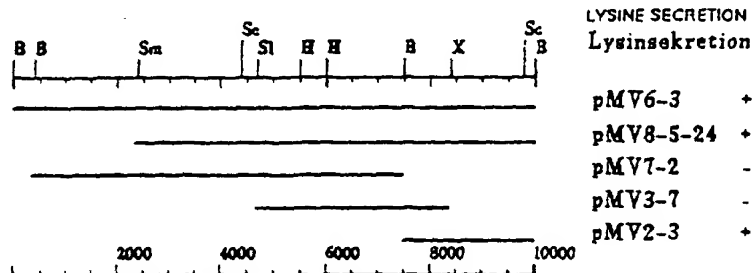


INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/23597
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	3. Juli 1997 (03.07.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/02485		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, JP, KR, MX, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 18. December 1996 (18.12.96)			
(30) Prioritätsdaten: 195 48 222.0 22. December 1995 (22.12.95) DE		Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH (DE/DE); Wilhelm-Johnen Strasse, D-52425 Jülich (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VRLIJC, Marina (DE/DE); Steinstrasser Allee 60, D-52428 Jülich (DE). EGGELING, Lothar (DE/DE); Elsenkamp 6, D-52428 Jülich (DE). SAHM, Hermann (DE/DE); Wendelinusstrasse 71, D- 52428 Jülich (DE).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH; Rechts- und Patentabteilung, D-52425 Jülich (DE).			

(54) Title: PROCESS FOR THE MICROBIAL PRODUCTION OF AMINO ACIDS BY BOOSTED ACTIVITY OF EXPORT CARRIERS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON AMINOSÄUREN DURCH GESTEIGERTE AKTIVITÄT VON EXPORTCARRIERN



(57) Abstract

The invention pertains to a process for the microbial production of amino acids. The process in question involves boosting the export carrier activity and/or export gene expression of a micro-organism which produces the desired amino acid. According to the invention, it was found that a single specific gene is responsible for the export of a given amino acid, and on that basis a process for the microbial production of amino acids, involving the controlled boosting of the export gene expression and/or export carrier activity of a micro-organism which produces the amino acid in question, has been developed for the first time. The boosted expression or activity of the export carrier resulting from this process increases the secretion rate and thus increases transport of the desired amino acid.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren, bei dem die Exportcarrieraktivität und/oder die Exportgenexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Erfindungsgemäß wurde gefunden, daß für den Export von Aminosäuren jeweils nur ein einziges, spezifisches Gen verantwortlich ist, so daß erfindungsgemäß erstmals ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren zur Verfügung gestellt wird, bei dem gezielt die Exportgenexpression und/oder die Exportcarrieraktivität eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Die aus dieser Verfahrensweise resultierende, gesteigerte Expression bzw. Aktivität des Exportcarriers führt zu einer erhöhten Sekretionsrate, so daß der Transport der entsprechenden Aminosäure erhöht ist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LT	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

B e s c h r e i b u n g

Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren
5 durch gesteigerte Aktivität von Exportcarriern

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Her-
stellung von Aminosäuren gemäß den Ansprüchen 1 bis
10 20, Ex-portgene nach Anspruch 21 bis 26, Regulatorgene
nach Anspruch 27 und 28, Genstrukturen gemäß den An-
sprüchen 29 und 30, Vektoren nach Anspruch 31 bis 33,
transformierte Zellen nach Anspruch 34 bis 40, Membran-
proteine gemäß Anspruch 41 und 42 sowie Verwendungen
15 nach Anspruch 43 bis 48.

Aminosäuren sind von großem wirtschaftlichen Interesse,
wobei die Verwendung von Aminosäuren vielfältig ist: So
wird z.B. L-Lysin, wie auch L-Threonin, und L-
20 Tryptophan als Futtermittelzusatz benötigt, L-Glutamat
als Gewürzzusatz, L-Isoleucin und L-Tyrosin in der
pharmazeutischen Industrie, L-Arginin und L-Isoleucin
als Medikament, oder L-Glutamat und L-Phenylalanin als
Ausgangssubstanz zur Synthese von Feinchemikalien.

25 Eine bevorzugte Methode zur Herstellung dieser ver-
schiedensten Aminosäuren ist die biotechnologische Her-
stellung mittels Mikroorganismen; denn auf diese Weise
wird direkt die biologisch wirksame und optisch aktive
30 Form der jeweiligen Aminosäure erhalten, und es können
einfache und preisgünstige Rohstoffe eingesetzt werden.
Als Mikroorganismen werden z.B. Corynebacterium
glutamicum und seine Verwandten ssp. flavum und ssp.
lactofermentum (Liebl et al., Int J System Bacteriol

(1991) 41:255-260) wie auch *Escherichia coli* und verwandte Bakterien eingesetzt.

Diese Bakterien produzieren die Aminosäuren normalerweise aber nur in der zum Wachstum benötigten Menge, so daß also keine überschüssigen Aminosäuren gebildet und ausgeschieden werden. Dies ist darin begründet, daß in der Zelle die Biosynthese der Aminosäuren in vielfacher Weise kontrolliert wird. Folglich sind bereits verschiedenste Verfahren bekannt, um die Produktbildung durch Ausschaltung der Kontrollmechanismen zu steigern. Bei diesen Prozessen werden z.B. Aminosäureanaloga eingesetzt, um die effektive Regulation der Biosynthese auszuschalten. So ist ein Verfahren beschrieben, bei dem *Corynebacterium*-Stämme benutzt werden, die gegen L-Tyrosin- und L-Phenylalaninanaloga resistent sind (JP 19037/1976 und 39517/1978). Ebenso sind Verfahren beschrieben, bei denen gegenüber L-Lysin- oder auch L-Threoninanaloga resistente Bakterien eingesetzt werden, um die Kontrollmechanismen zu überwinden (EP 0 205 849 B1, UK Patent Application GB 2 152 509 A).

Weiterhin sind auch durch rekombinante DNA-Techniken konstruierte Mikroorganismen bekannt, bei denen ebenfalls die Regulation der Biosynthese aufgehoben ist, indem die Gene, die für die nicht mehr feedback-inhibierbaren Schlüsselenzyme kodieren, kloniert und exprimiert werden. So ist z.B. ein rekombinantes, L-Lysin produzierendes Bakterium mit plasmid-kodierter, feedback-resistenter Aspartatkinase bekannt (EP 0 381 527). Ebenso ist ein rekombinantes, L-Phenylalanin produzierendes Bakterium mit feedback-resistenter Prephenatdehydrogenase beschrieben (JP 124375/1986, EP 0 488 424). Darüber hinaus wurden auch durch Überexpres-

sion von Genen, die nicht für feedback-sensitive Enzyme der Aminosäuresynthese codieren, erhöhte Aminosäureausbeuten erreicht. So wird z.B. die Lysinbildung durch erhöhte Synthese der Dihydrodipicolinatsynthese verbessert (EP 0 197 335). Ebenso wird durch erhöhte Synthese der Threonindehydratase eine verbesserte Threoninbildung erreicht (EP 0 436 886 A1).

Weitere Versuche zur Erhöhung der Aminosäureproduktion zielen auf eine verbesserte Bereitstellung der zellulären Primär-metabolite des Zentralstoffwechsels. So ist bekannt, daß die durch rekombinante Techniken erreichte Überexpression der Transketolase eine verbesserte Produktbildung von L-Tryptophan, L-Tyrosin, oder L-Phenylalanin ermöglicht (EP 0 600 463 A2). Weiterhin führt die Reduktion der Phosphoenolpyruvatcarboxylase-Aktivität in *Corynebacterium* zu verbesserter Bildung aromatischer Aminosäuren (EP 0 3331 145).

Diese vielfältigen Versuche zur Produktivitätssteigerung sind insgesamt darauf gerichtet, die Limitation der cytosolischen Synthese der Aminosäuren zu überwinden. Als eine weitere Limitation kommt grundsätzlich aber auch der Export der im Zellinneren gebildeten Aminosäuren ins Kulturmedium in Betracht. Daher gibt es vereinzelte Ansätze, diesen Export und damit die Wirtschaftlichkeit der Aminosäureproduktion zu verbessern. So hat man die Zellpermeabilität bei *Corynebacterium* durch Biotinmangel, Detergenz- oder Penicillinbehandlung erhöht. Diese Ausschleusehilfen waren jedoch ausschließlich bei der Glutamatproduktion erfolgreich, während die Synthese anderer Aminosäuren auf diese Weise nicht verbessert werden konnte. Auch sind Bakterienstämme entwickelt worden, bei denen die Aktivität des

Sekretionssystems aufgrund chemischer oder physikalischer Mutation erhöht ist. Es wurde dadurch beispielsweise ein Corynebacterium glutamicum-Stamm erhalten, der sich durch eine verbesserte Sekretionsaktivität insbesondere für die L-Lysinproduktion eignet
(DE 42 03 320).

Insgesamt zeichnen sich alle bisher durchgeführten Versuche zur Erhöhung der Sekretion zellintern gebildeter Aminosäuren dadurch aus, daß ein erhöhter Efflux von Aminosäuren aufgrund der gewählten ungerichteten bzw. unspezifischen Methoden nur durch Zufall erreicht werden konnte. Einzig in der Deutschen Patentanmeldung No. 195 23 279.8-41 ist ein Verfahren beschrieben, das es erlaubt, die Sekretion zellintern gebildeter Aminosäuren ganz gezielt zu erhöhen, indem die Expression von für den Import von Aminosäuren kodierenden Genen erhöht wurde. Die dieser Vorgehensweise zugrundeliegende Erkenntnis, daß die Zelle Importproteine für den Export von Aminosäuren verwendet wie auch die Tatsache, daß Mikroorganismen von Natur aus keine überschüssigen Aminosäuren bilden und ausscheiden, legt die Vermutung nahe, daß für den Aminosäuretransport spezifische Exportgene bzw. -proteine gar nicht existieren, sondern daß aus der Zelle die Aminosäuren über andere Exportsysteme exkretiert werden.

Die bisher bekannten Exportsysteme exportieren giftige Metallionen, toxische Antibiotika und höhermolekulare Toxine. Diese Exportsysteme sind relativ komplex aufgebaut: In der Regel sind Membranproteine der Cytoplasmamembran beteiligt, die jedoch nur eine Teilreaktion des Exports bewirken, so daß vermutlich für den Transport zusätzliche, extracytoplasmatische Hilfsproteine erfor-

derlich sind (Dinh, T. et al., A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 1994, 176: 3825-3831). Des weiteren
5 ist bekannt, daß bei dem sec-abhängigen Exportsystem für extrazelluläre Proteine mindestens 6 verschiedene Proteinkomponenten für den Export essentiell sind. Dieser Stand der Technik legt die Vermutung nahe, daß
10 ebenso die für den Export von Aminosäuren zuständigen, aber bislang unbekannten Systeme aus mehreren Proteinkomponenten bestehen bzw. mehrere Gene für den Export von Aminosäuren zuständig sind. Hinweis dafür könnten die von Vrljic et al. beschriebenen (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) verschiedenen, im Lysinexport defekten
15 Mutanten sein.

Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß für den Export von Aminosäuren jeweils nur ein einziges, spezifisches Gen verantwortlich ist, so daß erfindungsgemäß erstmals ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren zur Verfügung gestellt wird, bei dem gezielt die Exportgen-Expression und/oder die Exportcarrier-Aktivität eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Die aus
20 dieser Verfahrensweise resultierende, gesteigerte Expression bzw. Aktivität des Exportcarriers führt zu einer erhöhten Sekretionsrate, so daß der Export der entsprechenden Aminosäure erhöht ist. Auch akkumulieren
25 derart veränderte Mikroorganismen einen erhöhten Anteil der entsprechenden Aminosäure im Kulturmedium.
30

Zur Erhöhung der Exportcarrier-Aktivität wird insbesondere die endogene Aktivität eines Aminosäureproduzierenden Mikroorganismus erhöht. Eine Erhöhung

der Enzymaktivität kann beispielsweise erreicht werden, indem durch Veränderung des katalytischen Zentrums ein erhöhter Substratumsatz erfolgt oder indem die Wirkung von Enzyminhibitoren aufgehoben wird. Auch kann eine

5 erhöhte Enzymaktivität durch Erhöhung der Enzymsynthese, beispielsweise durch Genamplifikationen oder durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzym-Biosynthese reprimieren, hervorgerufen werden. Die endogene Export-carrier-Aktivität wird vorzugsweise durch Mutation des

10 endogenen Exportgens erhöht. Derartige Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder mutationsauslösenden Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletion(en),

15 Insertion(en) und/oder Nukleotidaustausch(e).

Die Exportgen-Expression wird durch Erhöhen der Genkopienzahl und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Exportgen-Expression positiv beeinflussen, erhöht. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die Transkriptionssignale erhöht werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß durch Veränderung der dem Strukturgen vorge-

20 schalteten Promotorsequenz der Promotor in seiner Wirksamkeit erhöht wird oder indem der Promotor komplett durch wirksamere Promotoren ausgetauscht wird. Auch kann eine Verstärkung der Transkription durch entsprechende Beeinflußung eines dem Exportgen zugeordneten

25 Regulatorgens erfolgen, wie weiter unten ausgeführt wird. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird.

30

Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das Exportgen in ein Genkonstrukt bzw. in einen Vektor eingebaut, vorzugsweise in einen Vektor mit niedriger Kopienzahl. Das Genkonstrukt enthält insbesondere dem Exportgen zugeordnete regulatorische Gensequenzen, vorzugsweise solche, die die Genexpression verstärken. Die regulatorischen Gensequenzen weisen insbesondere eine für die in Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodierende Nukleotidsequenz bzw. eine Nukleotidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz auf. Allelvariationen bzw. gleichwirkende DNA-Sequenzen umfassen insbesondere funktionelle Derivate, die durch Deletion(en), Insertion(en) und/oder Substitution(en) von Nukleotiden aus entsprechenden Sequenzen erhältlich sind, wobei aber die Regulatorprotein-Aktivität bzw. -Funktion erhalten bleibt oder sogar erhöht ist: So kann durch Mutation der regulatorischen Gensequenz die Effektivität der Bindung des Regulatorproteins an die DNA des zu regulierenden Exportgens so beeinflussen sein, daß dadurch die Transkription verstärkt und somit die Genexpression erhöht ist. Des Weiteren können dem Exportgen als regulatorische Sequenzen aber auch sog. "enhancer" zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA ebenfalls eine erhöhte Exportgen-Expression bewirken.

Für den Einbau des Exportgens in ein Genkonstrukt wird das Exportgen vorzugsweise aus einem Mikroorganismen-Stamm der Gattung Corynebacterium isoliert, und mit dem das Exportgen enthaltende Genkonstrukt ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismen-Stamm, insbesondere Corynebacterium, transformiert. Die Iso-

lierung und Transformation des entsprechenden Transportgens erfolgt nach gängigen Methoden: Im Falle der Isolierung und Klonierung eines Transportgens aus *Corynebacterium* eignet sich beispielsweise die Methode der homologen Komplementation einer exportdefekten Mutante (*J Bacteriol* (1995) 177: 4021-4027). Falls keine direkte Klonierung des Strukturgens möglich ist, kann zunächst auch die Insertion von Vektorsequenzen in das Transportgen erfolgen, um es dann über "plasmid-rescue" in Form inaktiver Fragmente zu isolieren. Für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich insbesondere Gene aus *C. glutamicum* ATCC 13032 oder *C. glutamicum* ssp. *flavum* ATCC 14067 oder auch *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* ATCC 13869. Nach Isolierung der Gene und deren in vitro-Rekombination mit bekannten Vektoren (*Appl Env Microbiol* (1989) 55: 684-688; *Gene* 102 (1991) 93-98), erfolgt die Transformation in die Aminosäureproduzierenden Stämme durch Elektroporation (Liebl et al. (1989) *FEMS Microbiol Lett* 65: 299-304) oder Konjugation (Schäfer et al. (1990) *J Bacteriol* 172: 1663-1666). Für die Übertragung werden vorzugsweise Vektoren mit niedriger Kopienzahl eingesetzt. Als Wirtszellen werden vorzugsweise solche Aminosäureproduzenten eingesetzt, die in der Synthese der entsprechenden Aminosäuren dereguliert sind und/oder die einen erhöhten Anteil an Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten.

Nach Isolierung sind Exportgene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die in Tabelle 3 angegebene Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodieren bzw. die die Nukleotidsequenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz aufweisen. Auch hier umfassen Allelvariationen bzw. gleichwirkende DNA-Sequenzen insbe-

sondere funktionelle Derivate im oben für die regulatorischen Sequenzen angegebenen Sinne. Diese Exportgene werden vorzugsweise im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt.

5

Dem Exportgen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne zugeordnetem Regulatorgen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur enthalten

10

ist.

Durch Klonierung von Exportgenen sind Plasmide bzw. Vektoren erhältlich, die das Exportgen enthalten und - wie bereits oben erwähnt - zur Transformation eines Aminosäure-Produzenten geeignet sind. Die durch Transformation erhältlichen Zellen, bei denen es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von *Corynebacterium* handelt, enthalten das Gen in replizierbarer Form, d.h. in zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die Genkopien durch homologe Rekombination an beliebigen Stellen des Genoms integriert werden, und/oder auf einem Plasmid bzw. Vektor.

15

20

25

30

Es sind eine Vielzahl von Sequenzen bekannt, die für Membran-proteine unbekannter Funktion kodieren. Durch die erfindungs-gemäße Bereitstellung von Exportgenen, wie beispielsweise des Exportgens mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2, bzw. der entsprechenden Exportproteine, wie z.B. das mit der Aminosäuresequenz gemäß Tabelle 1, können nunmehr Membranproteine, deren Funktion der Transport von Aminosäuren ist, durch Sequenzvergleich identifiziert werden. Das damit identifizierte Exportgen kann anschlie-

ßend zur Verbesserung der Aminosäureproduktion nach dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden.

Die aus dem Stand der Technik bekannten Membranproteine be-sitzen in der Regel 12, zum Teil auch 4 transmembrane Helices. Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß die für den Export von Aminosäuren zuständigen bzw. geeigneten Membranproteine 6 transmembrane Helices aufweisen (vgl. z.B. die in Tabelle 3 aufgeführte Aminosäuresequenz eines Exportproteins, bei der die 6 transmembranen Bereiche durch Unterstreichen kenntlich gemacht sind). Damit liegt hier eine bisher noch nicht beschriebene und somit neue Klasse von Membranproteinen vor.

15

Ausführungsbeispiele

a) Klonierung eines Exportgens und Klonierung eines Regulators aus *Corynebacterium glutamicum*

20

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* R127 (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) wurde, wie bei Scharzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87) beschrieben, isoliert. Diese wurde mit dem Restriktionsenzym Sau3A gespalten und durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation, wie bei Sambrook et al. (Molecular Cloning, A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) beschrieben, aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden gelelektrophoretisch auf ihre Größe hin analysiert und die Fraktion mit einer Fragmentgröße von etwa 6-10 kb zur Ligation mit dem Vektor pJC1 eingesetzt. Dazu wurde der Vektor pJC1 mit BamHI linearisiert und dephosphoryliert. Fünf ng davon wurde mit 20 ng der chromosomalen 6-10 kb Fragmente ligiert. Mit dem gesamten Ligations-

30

ansatz wurde die exportdefekte Mutante NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) durch Elektroporation (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) transformiert. Die Transformanten wurden auf LBHIS (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) mit 15 µg Kanamycin pro ml selektioniert. Diese Transformanten wurden umfangreichen Plasmidanalysen unterzogen, indem 200 der insgesamt 4500 erhaltenen Klone einzeln angezogen, und deren Plasmidanteil, und -größe bestimmt wurden. Im Durchschnitt trug etwa die Hälfte der untersuchten Kanamycin-resistenten Klone ein rekombinantes Plasmid mit einem Insert der durchschnittlichen Größe von 8 kb. Damit ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von 0,96 für die Anwesenheit jedes x-beliebigen Gens aus *C. glutamicum* in der errichteten Genbank. Die 4500 erhaltenen Transformanten wurden alle einzeln auf Wiedererhalt der Lysinsekretion geprüft. Dazu wurde das von Vrljic beschriebene System zur Induktion der L-Lysinausscheidung in *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027). Dazu wurden sogenannte Minimal-medium-Indikatorplatten hergestellt, die pro Liter 20 g (NH₄)₂SO₄, 5 g Harnstoff, 1 g KH₂PO₄, 1 g K₂HPO₄, 0,25 g MgSO₄ x 7 H₂O, 42 g Morpholinopropansulfonsäure, 1 ml CaCl₂ (1 g/100 ml), 750 ml dest., 1ml Cg Spuren-salze, 1 ml Biotin (20 mg/100 ml), pH7, 4 % Glukose 1,8 mg Protokatechusäure, 1 mg FeSO₄ x 7 H₂O, 1 mg MnSO₄ x H₂O, 0,1 mg ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,02 mg CuSO₄, 0,002 mg NiCl₂ 6 H₂O, 20 g Agar-Agar, sowie 10⁷ Zellen/ml der Lysin-auxotrophen *C. glutamicum* Mutante 49/3 enthielten. Die ursprünglichen 4500 Transformanten wurden alle einzeln mittels Zahnstocher auf die Indikatorplatten gepickt, mit jeweils einer Kontrolle des ursprünglichen Nichtausscheiders NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) und des Ausgangsstammes R127. Parallel

wurden jeweils 2 Platten beimpft, von denen nur eine zusätzlich 5 mM L-Methionin enthielt, um so die Lysin-ausscheidung zu induzieren. Die Indikatorplatten wurden bei 30 °C inkubiert, und nach 15, 24 und 48 Stunden untersucht. Insgesamt wurden so 29 Klone erhalten, die auf der mit Methionin versetzten Indikatorplatte einen Wachstumshof durch den Indikationsstamms 49/3 zeigten. Die Klone wurden vereinzelt, und dann erneut, wie oben beschrieben, auf Wiedererhalt des Wachstumshofs geprüft. Auf diese Weise wurden die zwei Klone NA8 pMV8-5-24 und NA8 pMV6-3 erhalten, die die Fähigkeit wiedererhalten hatten, Lysin auszuscheiden.

Von diesen Klonen wurden Plasmidpräparationen, wie bei Schwarzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87) beschrieben, durchgeführt. Durch Retransformation in NA8 wurde der plasmidgebundene Effekt der Ausscheidung von L-Lysin bestätigt. Beide Plasmide wurden einer Restriktionsanalyse unterzogen. Plasmid pMV8-5-24 trägt ein Insert von 8,3 kb, und pMV6-3 eines von 9,5 kb. Die physikalische Kartierung der Inserts zeigt Figur 1.

b) Subklonierung eines DNA-Fragments, das den Lysinexport rekonstituiert

Vom Insert des Plasmids pMV6-3 wurden unter Nutzung der bestimmten Restriktionsschnittstellen einzelne Subklone hergestellt. So wurde das 3,7 kb XhoI-SalI-Fragment, das 2,3 kb BamHI-Fragment und das 7,2 kb BamHI-Fragment mit dem entsprechend geschnittenem und behandeltem Vektor pJC1 (Mol Gen Genet (1990) 220: 478-480) ligiert. Mit den Ligationsprodukten wurde direkt *C. glutamicum* NA8 transformiert, die Transformanten wie oben beschrieben auf Wiedererhalt der Lysinausscheidung ge-

prüft und die Anwesenheit des Subklons durch Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse bestätigt. Auf diese Weise wurde als kleinster Subklon der Stamm mit Plasmid pMV2-3 erhalten (Figur 1). Dieses, den Lysinexport vermittelnde Fragment enthält als Insert das
5 2,3 kb BamHI-Fragment aus pMV6-3.

c) Sequenz des Lysinexportgens *lysE* und dessen Regulators *lysG*

10

Die Nukleotidsequenz des 2,3 kb BamHI-Fragments wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. durchgeführt (Proc Natl Acad Sci USA (1977) 74: 5463-5467), und die Sequenzierungsreaktionen mit dem Auto-
15 Read Sequencing kit von Pharmacia (Uppsala, Sweden). Die elektrophoretische Analyse erfolgte mit dem automatischen Laser-Fluoreszenz DNA Sequenziergerät (A.L.F.) von Pharmacia-LKB (Piscataway, NJ, USA). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programmpaket HUSAR
20 (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) analysiert. Die Nukleotidsequenz und das Ergebnis der Analyse ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Die Analyse ergibt zwei vollständige offene Leseraster (ORF) auf dem sequenzierten DNA-Stück. ORF1 kodiert für
25 ein Protein mit einer Länge von 236 Aminosäuren, ORF2 für eins mit einer Länge von 290 Aminosäuren. Das von ORF1 abgeleitete Protein zeigt eine Häufung hydrophober Aminosäuren, wie sie für membranständige Proteine charakteristisch ist. Die detaillierte Analyse der Verteilung der hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren mit
30 dem Programm PHD.HTM (Protein Science (1995) 4: 521-533) ist in Tabelle 3 gezeigt. Daraus ergibt sich, daß das Protein sechs hydrophobe Helixbereiche enthält, die die Membran durchqueren. Damit handelt es sich bei die-

sem Protein um den gesuchten Exporter der Aminosäure L-Lysin. Das entsprechende Gen wird deswegen im Folgenden als lysE bezeichnet. Es ist entsprechend in Tabelle 2 markiert. ORF2 wird in Gegenrichtung zu ORF1 transkribiert. Die Sequenzanalyse zeigt, daß ORF2 hohe Identität mit Regulatorgenen hat, die als eine Familie zusammengefaßt werden (Ann Rev Microbiol (1993) 597-626). Gene dieser Familie regulieren die Expression der verschiedensten an katabolen oder anabolen Prozessen beteiligter Gene in positiver Weise. Im Folgenden wird ORF2 deswegen als lysG (Govern = Regulieren) bezeichnet. Wegen dieser Zuordnung, und weil lysE nur zusammen mit lysG kloniert (siehe a)) und subkloniert werden konnte (siehe b)), ist lysG Regulator von lysE und somit ebenfalls am Lysinexport beteiligt. Das Gen lysG und dessen abgeleitete Aminosäuresequenz sind ebenfalls in Tabelle 2 bzw. Tabelle 1 gezeigt.

d) Identifizierung eines unbekannten Membranproteins aus *Escherichia coli* durch Sequenzvergleich

Mit den etablierten Sequenzen gemäß Tabelle 3 können bereits existierende Sequenzbanken durchsucht werden, um so den von sequenzierten Bereichen abgeleiteten Proteinen eine Funktion zuzuordnen. Entsprechend wurde die Aminosäuresequenz des Lysinexporters aus *C. glutamicum* unter Zuhilfenahme des Programmpakets HUSAR (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) mit abgeleiteten Protein-Sequenzen aller dort deponierten DNA-Sequenzen verglichen. Zu einer einzigen Sequenz bisher unbekannter Funktion aus *E. coli* ergab sich eine hohe Homologie von 39,3 % identischen Aminosäuren, und 64,9 % ähnlichen Aminosäuren. Der Vergleich ist in Figur 2 gezeigt. Das bislang nicht charakterisierte offe-

ne Leseraster aus *E. coli* ist über dieses Verfahren damit als ein Aminosäureexportgen identifiziert.

e) Gesteigerter Export intrazellulär akkumulierten L-Lysins

Der Stamm *C. glutamicum* NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) wurde mit Plasmid pMV2-3 transformiert, und die L-Lysinausscheidung der Stämme verglichen. Dazu wurden NA8 und NA8pMV2-3 in Komplexmedium wie bei Vrljic et al. (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) beschrieben angezogen, und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol (1993) 175: 5595-5603) jeweils getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich 5 mM L-Methionin, um die intrazelluläre L-Lysinbiosynthese zu induzieren. Nach Kultivierung für 24 Stunden bei 30 °C auf dem Rotationsschüttler bei 140 Upm wurde zellinterne und externe L-Lysinbestimmungen durchgeführt. Zur zellinternen Bestimmung wurden Silikonölzentrifugationen durchgeführt (Methods Enzymology LV (1979) 547-567); die Bestimmung der Aminosäuren erfolgte mittels Hochdruckflüssigchromatografie (J Chromat (1983) 266: 471-482). Diese Bestimmungen wurden zu verschiedenen Zeiten, wie in Figur 3 angegeben, durchgeführt. Entsprechend dem benutzten Verfahren wird das angestaute zellinterne L-Lysin also durch pMV2-3 vermehrt ausgeschieden und akkumuliert. Entsprechend ist erwartungsgemäß auch das zellintern vorhandene L-Lysins stark reduziert. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Exporters ein Verfahren dar, um die L-Lysinbildung entscheidend zu verbessern.

f) Gesteigerte Akkumulation von L-Lysin durch *lysE* oder *lysEG*

Vom Subclon pMV2-3, der das sequenzierte 2374 bp BamHI-Fragment in pJC1 enthält (siehe Figur 1), wurde entsprechend der Sequenzinformation das lysE tragende
5 1173 bp PvuII-HindII Fragment in pZ1 (Appl Env Microbiol (1989) 55: 684-688) ligiert, und so das Plasmid plysE erhalten. Dieses Plasmid, sowie das lysElysG tragende Plasmid pMV2-3 wurde durch Elektroporation in C. glutamicum Stamm d eingeführt, indem chromosomale Be-
10 reiche deletiert sind. Die erhaltenen Stämme C. glutamicum d pMV2-3, C. glutamicum d plysE, C. glutamicum pJC1 wurden wie unter e) beschrieben zunächst auf Komplexmedium vorgezogen, dann in Produktionsminimalmedium CGXII zusammen mit 4% Glukose und 5 mM
15 L-Methionin kultiviert, und Proben zur Bestimmung des akkumulierten L-Lysins entnommen. Wie aus Figur 4 ersichtlich, wird durch lysElysG eine Steigerung der Lysinakkumulation gegenüber der Kontrolle erreicht. Die plysE wird durch dieses Verfahren eine außerordentlich
20 gesteigerte Akkumulation von 4,8 auf 13,2 mM L-lysin erreicht.

Legenden der Tabellen und Figuren:

5 Tabelle 1: Die Aminosäuresequenz des Lysinexporter-Regulators aus *Corynebacterium glutamicum*, mit dem für DNA-bindende Proteine typischen Helix-Turn-Helix Motif.

10 Tabelle 2 (drei Seiten): Die Nukleotidsequenz des für den Lysinexporter und Lysinexport-Regulators codierenden Bereichs aus *C. glutamicum*.

15 Tabelle 3: Die Aminosäuresequenz des Lysinexporters aus *Corynebacterium glutamicum*, mit den identifizierten transmembranen Helices TMH1 bis TMH6.

20 Figur 1: Die durch die Klonierung erhaltenen DNA-Fragmente in pMV6-3 und pMV8-5-24, die die Lysinsekretion bewirken, sowie der aus pMV6-3 hergestellte Subklon pMV2-3, der ebenfalls die Lysinsekretion bewirkt und sequenziert wurde. B, BamHI; Sm, SmaI; Sc, SacI; Sl, SalI; H, HindIII; X, XhoI.

25 Figur 2: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von Lyse aus *C. glutamicum* (oben), mit einem Genprodukt bislang unbekannter Funktion aus *Escherichia coli* (unten), das dadurch als Exportcarrier identifiziert ist.

30 Figur 3: Gesteigerter Lysinexport durch pMV2-3 mit *C. glutamicum* NA8. Oben, die Kontrolle mit geringer Ausscheidung und zellinternem Anstau von Lysin bis etwa 150 mM. Unten die durch pMV2-3 bewirkte hohe Ausscheidung mit zellinternem nur geringem Anstau von etwa 30 mM.

Figur 4: Die Steigerung der Lysinakkumulation in *C. glutamicum* durch *lysElysG* (pMV2-3) (mittlere Kurve), und die durch *lysE* (plysE) bedingte Akkumulation (obere s Kurve).

1 MNPIQLDTLL SIIDEGSFEG ASLALSISES AVSQRVFALE HHVGRVLVSR

Helix-Turn-Helix-Motiv

51 TQPAKATEAG EVLVQAARKM VLLQAEYKAO LSGRIEHIPL TIAHDESL

101 TWFPVPFNEV ASWGGATLTL RLEDEANTLS LLREGDVLGA VTREANPVAG

151 CEVVELGTMR HLAIAATPSLR DAYNVDGKLL WREHPVIREG PKDVLQDRDL

201 DGRVDGPVGR RRVSIVPSAE GFGEAIRRGL GNGLLFETQA AFMLKAGEVI

251 LLDEIPIDTP NYWQWRLES RSLARLTDAV YDAEIFGLPP

Tabelle 1

GGTAAACGACTTCCACAATGAGACGGACCGGGTTAAGGACGCCCGCTTCTTCACTTTTTC 60
GGACTTGGAAAAGTCTTCATTGATTCCGGCGTTAGGGAGCTAACGACGTAGTTGCTGCCG 120
- P R L G E I A A D V V A
CAGACACTCAGATCGATCTCTAGATCTAAGGTCCGCGGTAGCAACGGTTATGTAGCCACA 180
D T L R A L S R S E L R W R Q W Y M P T
CAGTTACCCATAGAGTAGCTCCTCCTAGTGAAGAGGACGAAAATCGTACCCTCGTCGAAC 240
D I P I E D L L I V E G A K L M P A A Q
CCAAAGCCCTTCTTCAGGGGTTGGTTCCGGAGCCGCTTAACGGAGTGGTTTTGGAAGGCG 300
T E P L L G W G L G R R I A E G F G E A
GCTGCCCTGTACCTATGCGCGGACGCGGGGTGTCTGGTAGCTGCGCGGGCAGGTCCAG 360
S P V I S V R R R G V P G D V R G D L D
TGCCAGAACTTCGTGTAGAAACCCTGGCTTCGCATTCTGCCCGTAGCGTCGGGTTAGATC 420
R D Q L V D K P G F R L V P M A A W D L
AAAGGGTAGTTGGTACATCCGTAGGGCGTTACTCCCCAACGTTACCGGTTACCGCGTA 480
K G D V M Y A D R L S P T A I A L H R M
CCAAGGTTCAAGATGATGAAGTGTAGGGCGGTGCCCTAATCGAAGTGCCCAATGGCGAGG 540
T G L E V V E C G A V P N A E R T V A G
ATTTTGTAGAGGTGCGGCGTCGTTCTTATTACACACGCGAAGTAGAAGGTTGCGTCGCA 600
L V D G R R L L S L T H A E D E L R L T
CTCGCAACGAGGTGGGGTTCTTCGATGGAGCAACTTGTGCCCTCCTTTGGTACACCTATC 660
L T A G G W S A V E N F V P P F W T S L
GCTTAGACGCAACTACCGCTACCAATTGCCCTAAAGTCGTTCCGCAGGTCTATCAACGCG 720
S D A N I A I T L P I E A L R G S L Q A
AAATCAAAGACGAACGTCGTTGTGGTAAAAGGCGCGACGAACGTGTTCTGAAGTGGGCG 780
K T E A Q L L V M K R A A Q V L V E G A
AAGCCAACGAAACCGGCCAACCACGCGCTATGGTTGTGAGCTGGGTGCACTACGAGCTC 840
E T A K A P Q T R S V L V R G V H H E L
TCGAAATTGCGCGACTGAGTGGCGGCTCCCCCTTTACCTTTCCCGATTCTCCGCGGAAG 900
A K V R Q S V A S P S I S L A L S A G E

Tabelle 2

ERSATZBLATT (REGEL 26)

960

<---LysG

CTTCGACGGAAGTAGTTACTAAGTCTCGTTTCACAGGTCAACTTACCCCAAGTA-----5'

5'---TGCCTTCATCAATGATTGAGAGCAAAGTGTCCAGTTGAATGGGGTTCATGAAGCT

F S G E D I I S L L T D L Q I P N M

1020

ATATTAAACCATGTTAAGAACCAATCATTTTACTTAAAGTACTTCCATAGGTCACGATGGT

M V

LysE--->

1080

GATCATGGAAATCTTCATTACAGGTCTGCTTTTGGGGGCCAGTCTTTTACTGTCCATCGG

I M E I F I T G L L L G A S L L L S I G

1140

ACCGCAGAATGTACTGGTGATTAAACAAGGAATTAAGCGCGAAGGACTCATTGCGGTTCT

P Q N V L V I K Q G I K R E G L I A V L

1200

TCTCGTGTGTTTAATTTCTGACGTCTTTTGTTCATCGCCGGCACCTTGGGCGTTGATCT

L V C L I S D V F L F I A G T L G V D L

1260

TTTGTCCAATGCCGCGCCGATCGTGCTCGATATTATGCGCTGGGGTGGCATCGCTTACCT

L S N A A P I V L D I M R W G G I A Y L

1320

GTTATGGTTTGCCGTCATGGCAGCGAAAGACGCCATGACAAACAAGGTGGAAGCGCCACA

L W F A V M A A K D A M T N K V E A P Q

1380

GATCATTGAAGAAACAGAACCAACCGTGCCCGATGACACGCCTTTGGGCGGTTCCGGCGGT

I I E E T E P T V P D D T P L G G S A V

1440

GGCCACTGACACGCGCAACCGGGTGCGGGTGAGGTGAGCGTCGATAAGCAGCGGGTTTG

A T D T R N R V R V E V S V D K Q R V W

1500

GGTAAAGCCCATGTTGATGGCAATCGTGCTGACCTGGTTGAACCCGAATGCGTATTTGGA

V K P M L M A I V L T W L N P N A Y L D

1560

CGCGTTTGTGTTTATCGGCGGCGTCCGGCGCAATACGGCGACACCGGACGGTGGATTTT

A F V F I G G V G A Q Y G D T G R W I F

1620

CGCCGCTGGCGCGTTCGCGGCAAGCCTGATCTGGTTCCCGCTGGTGGGTTTCCGGCGCAGC

A A G A F A A S L I W F P L V G F G A A

1680

AGCATTGTCACGCCCCGTGTCCAGCCCCAAGGTGTGGCGCTGGATCAACGTCGTCGTGGC

A L S R P L S S P K V W R W I N V V V A

Tabelle 2 (fortgesetzt)

ERSATZBLATT (REGEL 26)

1740
 + orf3
 - N E R T K
 5' CTACTGGCGTAACCGGTAGTTTGA CTACA ACTACCCAATCAAAAGCGCCCAAAA
 AGTTGTGATGACCGCATTGGCCATCAA ACTGATGTTGATGGGTTAGTTTTCGCGGG 5'
 V V M T A L A I K L M L M G -
 Lyse +

1800
 CCTTAGCCACCGGAAGCGGGTTTACA ACTACGGCCG CAGCACCTTTAGAGTAGCTAGCG
 S D T A K A W I N I G A D H S I E D I A

1860
 GAGGTTGAGCCG CAGTCTTTGAGGTTCAACA ACTCACTTAGTTCCGACAACAGGTCGAC
 E L E A D S F E L N N L S D L S N D L Q

1920
 GAGTTGACTGCTTCGTGGTTAGTTACGTGAC CAGTGCCATAGGCGCGGCATGAGAGGAAC
 E V S S A G I L A S T V T D A G Y E G Q

1980
 GAGCGCGTCGTGGGTACGTTGCGCGGTAGACGCGTTC ACTGACGGGCGCAAGGACCCGCTA
 E R L V W A L A M Q A L S Q G R E Q A I

2040
 CAGTAACTCGAACGCCTGGTATAGTTATAACA AGTGCAAGTTGTACGGGAGTCTGTCCCT
 D N L K R V M D I N N V N L M G E S L S

2100
 GAATGGGACCGACCGCGCCCTTGGGAGACCTTAAGGTAGCTCTATAAACAGGCACTCGTC
 K G Q S A R S G E P I G D L Y K D T L L

2160
 CGGGACGCGTTCA CCACTCTTTTCGTTACTGCGGTTCTGGTAACAACCGTCGACTGACGTT
 G Q A L P S F A I V G L G N N A A S Q L

2220
 GTTCAAGAGTGGCAGTAGCGGGCCAAGGAGGTGGGTTGCTAATTACTACCTTATCGAACC
 L N E G D D G P E E V W R N I I S Y S P

2280
 GACTACTTAGTCTTCGCCCCGTCGGGAGGAGGCGGTACTTGAGTCGGCGGAGGCGACACTC
 Q H I L L P C G E E A M F E A A E A T L

2340
 GAGACCTGGCATCCTTCTTTATGGGTGCATTTCTCGGAAAGGTCTGCGTTGTTACAGTGC
 E P G Y S S I G V Y L A K G S A V I D R

2374
 <-orf3+
 GTTACGCATGTACCAAAGAAGGTTTCCTCATAGA
 L A Y M T E E L P T D

Tabelle 2 (fortgesetzt)

1 MVIMEIFITG LLLGASLLS IGPQNVLTIN QGIRREGLIA VLLVCLISDV TMH2

51 FLFIAGTLGV DLLSNAAPIV LDIMRWGGIA VLLWFAVMAA KDAWTHKVEA TMH1

101 PQIIETEPT VPDDTEPLGGS AVATDTRIRV PTEVSVEKOR WTKENLNAI TMH3

151 VLTWLNPNAY LDAFVFIGGV GAQYGDTCRW IEPAGAFARS LIWFPLVGFG TMH4

201 AAALSRLSS PKVWRWINV VAVVMTALRI KLTHIG TMH5

TMH6

Tabelle 3

P a t e n t a n s p r ü c h e

- 5
1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren, bei dem die Exportcarrier-Aktivität und/oder die Exportgen-Expression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird.
10
 2. Verfahren nach Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die endogene Exportcarrier-Aktivität des Mikroorganismus erhöht wird.
15
 3. Verfahren nach Anspruch 2,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß durch Mutation des endogenen Exportgens ein Carrier mit höherer Export-Aktivität erzeugt wird.
20
 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Genexpression des Exportcarriers durch Erhöhen der Genkopienzahl erhöht wird.
25
 5. Verfahren nach Anspruch 4,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß zur Erhöhung der Genkopienzahl das Exportgen in ein Genkonstrukt eingebaut wird.
30
 6. Verfahren nach Anspruch 5,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,

daß das Exportgen in einen Vektor mit niedriger Kopienzahl eingebaut wird.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6,
5 dadurch gekennzeichnet,
daß das Exportgen in ein Genkonstrukt eingebaut wird, das dem Exportgen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält.
- 10 8. Verfahren nach Anspruch 7,
 dadurch gekennzeichnet,
daß die regulatorische Gensequenz eine für die in Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen kodierende Nukleotidsequenz auf-
15 weist.
9. Verfahren nach Anspruch 8,
 dadurch gekennzeichnet,
daß die regulatorische Gensequenz eine Nukleo-
20 tidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz aufweist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 9,
25 dadurch gekennzeichnet,
daß ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismus mit dem das Exportgen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
- 30 11. Verfahren nach Anspruch 10,
 dadurch gekennzeichnet,
daß ein Mikroorganismus der Gattung Corynebacterium mit dem das Exportgen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß für die Transformation ein Mikroorganismus
5 eingesetzt wird, in dem die an der Synthese der
entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme de-
reguliert sind.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12,
10 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß für die Transformation ein Mikroorganismus
eingesetzt wird, der einen erhöhten Anteil an
Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.
- 15 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 13,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß das Exportgen aus einem Mikroorganismen-Stamm
der Gattung Corynebacterium isoliert wird.
- 20 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprü-
che,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Exportgensequenz durch Vergleich mit der
Sequenz eines bereits bekannten Exportgens iden-
25 tifiziert wird.
16. Verfahren nach Anspruch 15,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die von der zu identifizierenden Exportgense-
30 quenz abgeleitete Aminosäuresequenz mit der in
Tabelle 3 angegebenen Aminosäuresequenz oder de-
ren Allelvariationen verglichen wird.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Exportgen-Expression durch Verstärkung
5 der Transkriptionssignale erhöht wird.
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß als Exportgen ein Gen mit einer für die in
Tabelle 3 angegebene Aminosäuresequenz und deren
Allelvariationen kodierenden Nukleotidsequenz
eingesetzt wird.
- 15 19. Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Exportgen ein Gen mit der Nukleotidse-
quenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2
oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-
20 Sequenz eingesetzt wird.
20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche
zur Herstellung von L-Lysin.
- 25 21. Für einen Aminosäure-Exportcarrier kodierendes
Exportgen.
22. Exportgen nach Anspruch 21 mit einer für die in
Tabelle 3 angegebene Aminosäuresequenz und deren
30 Allelvariationen kodierenden Nukleotidsequenz.
23. Exportgen nach Anspruch 22 mit der Nukleotidse-
quenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2

oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz.

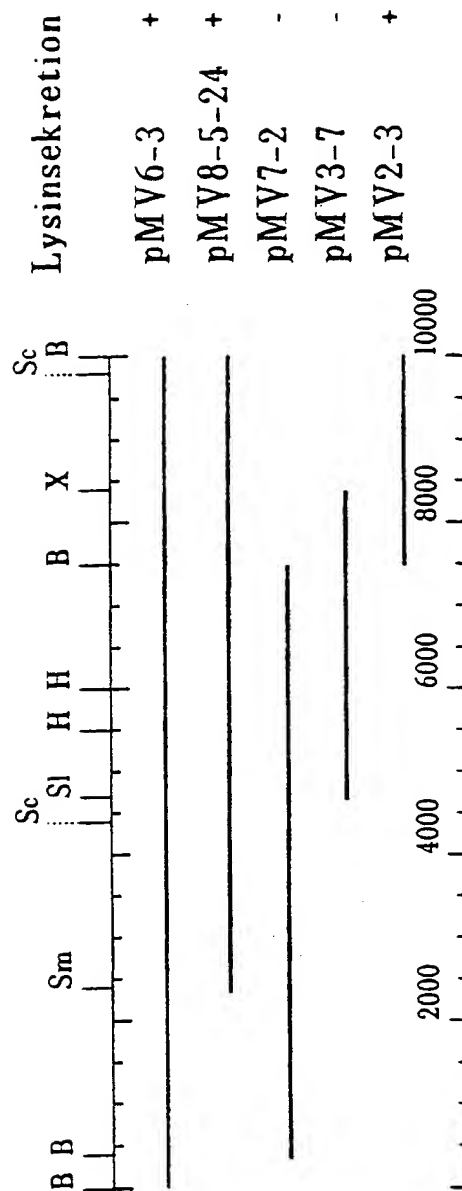
24. Exportgen nach einem der Ansprüche 21 bis 23 mit
5 diesem zugeordneten regulatorischen Gensequenzen.
25. Exportgen nach Anspruch 24,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die regulatorische Gensequenz eine für die in
10 Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz und deren
Allelvariationen kodierende Nukleotidsequenz auf-
weist.
26. Exportgen nach Anspruch 25,
15 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die regulatorische Gensequenz eine Nukleo-
tidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabel-
le 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkenden
DNA-Sequenz aufweist.
- 20 27. Zur Regulation eines für einen Aminosäure-
Exportcarrier kodierenden Exportgens geeignetes
Regulatorgen mit einer für die in Tabelle 1 ange-
gebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariatio-
25 nen kodierenden Nukleotidsequenz.
28. Regulatorgen nach Anspruch 27 mit der Nukleo-
tidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabel-
le 2 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden
30 DNA-Sequenz.
29. Genstruktur, enthaltend ein Exportgen nach einem
der Ansprüche 21 bis 26.

30. Genstruktur, enthaltend eine regulatorische Gensequenz nach Anspruch 27 oder 28.
31. Vektor, enthaltend ein Exportgen nach einem der Ansprüche 21 bis 26 oder eine Genstruktur nach Anspruch 29.
32. Vektor nach Anspruch 31 mit niedriger Kopienzahl.
33. Vektor, enthaltend eine regulatorische Gensequenz nach Anspruch 27 oder 28 oder eine Genstruktur nach Anspruch 30.
34. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form ein Exportgen nach einem der Ansprüche 21 bis 26 oder eine Genstruktur nach Anspruch 29.
35. Transformierte Zelle nach Anspruch 34, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 31 oder 32.
36. Transformierte Zelle nach Anspruch 34 oder 35, dadurch gekennzeichnet, daß sie der Gattung *Corynebacterium* angehört.
37. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 34 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß in dieser die an der Synthese beteiligten Enzyme der Aminosäure, die mittels des Exportcarriers, für das in die transformierte Zelle übertragene Exportgen kodiert, aus der Zelle ausgeschleust wird, dereguliert sind.

38. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 34 bis 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen erhöhten Anteil an Zentralstoff-
5 wechsellmetaboliten enthält.
39. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form eine regulatorische Gensequenz nach Anspruch 27 oder 28 oder eine Genstruktur nach Anspruch 30.
10
40. Transformierte Zelle nach Anspruch 39, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 33.
- 15 41. Für den Export von Aminosäuren geeignete Membranproteine mit 6 transmembranen Helices.
42. Membranprotein nach Anspruch 41 mit der in Tabelle 3 angegebenen Aminosäuresequenz, wobei Tabelle 3 Bestandteil dieses Anspruches ist.
20
43. Verwendung eines Exportgens zur Steigerung der Aminosäureproduktion von Mikroorganismen.
- 25 44. Verwendung nach Anspruch 43,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein mutiertes Exportgen, das für ein Enzym mit erhöhter Exportcarrier-Aktivität kodiert, verwendet wird.
30
45. Verwendung nach Anspruch 43 oder 44,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Aminosäure-produzierende Mikroorganismus

mit einem Genkonstrukt, das ein Exportgen enthält, transformiert wird.

46. Verwendung nach Anspruch 45,
5 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
 daß das Genkonstrukt zusätzlich regulatorische
 Gensequenzen trägt.
47. Verwendung nach einem der Ansprüche 43 bis 46,
10 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
 daß ein Exportgen aus Corynebacterium verwendet
 wird.
48. Verwendung nach einem der Ansprüche 43 bis 47,
15 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
 daß als Aminosäure-produzierender Mikroorganismus
 Corynebacterium verwendet wird.

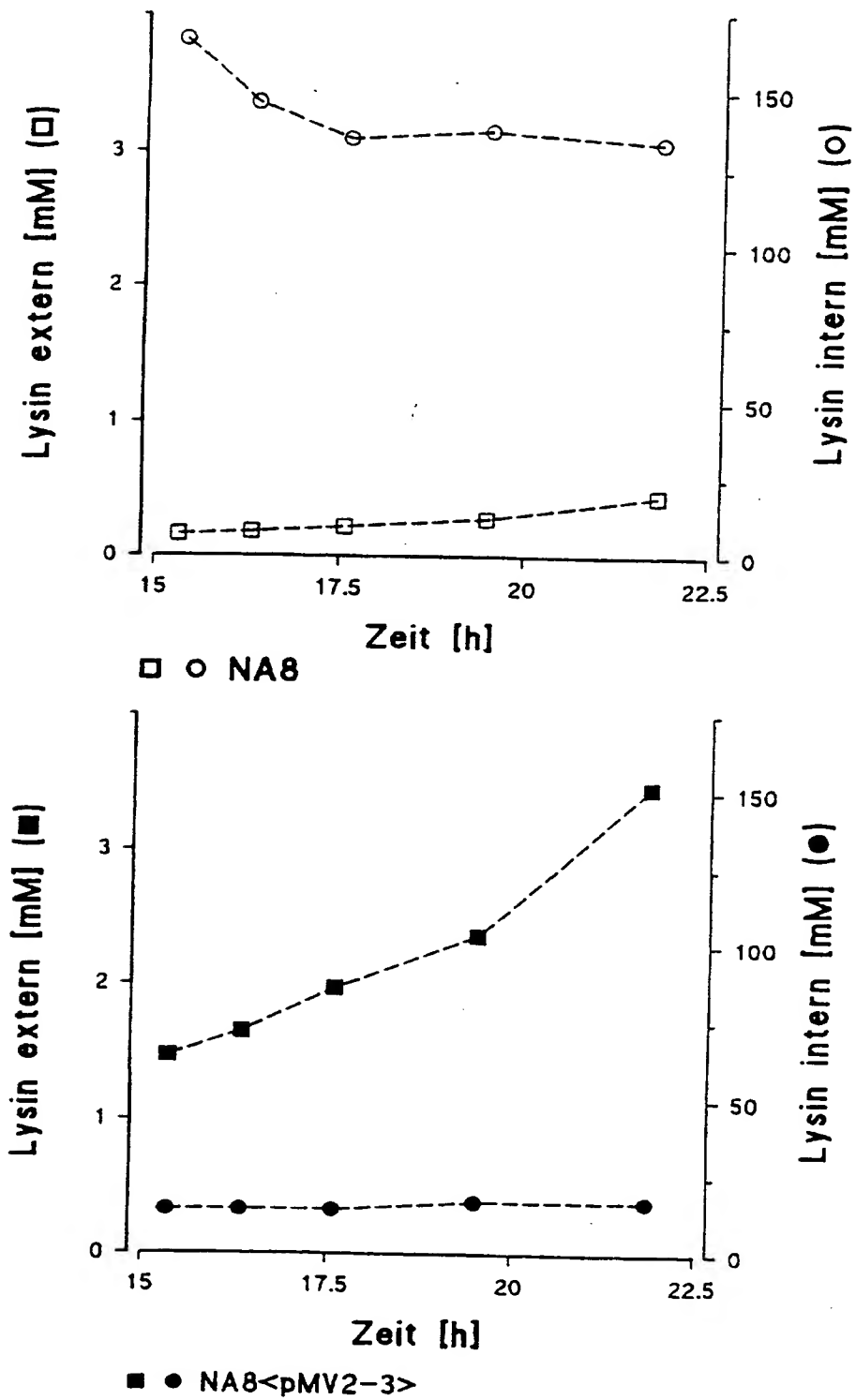


Figur 1

ERSATZBLATT (REGEL 26)

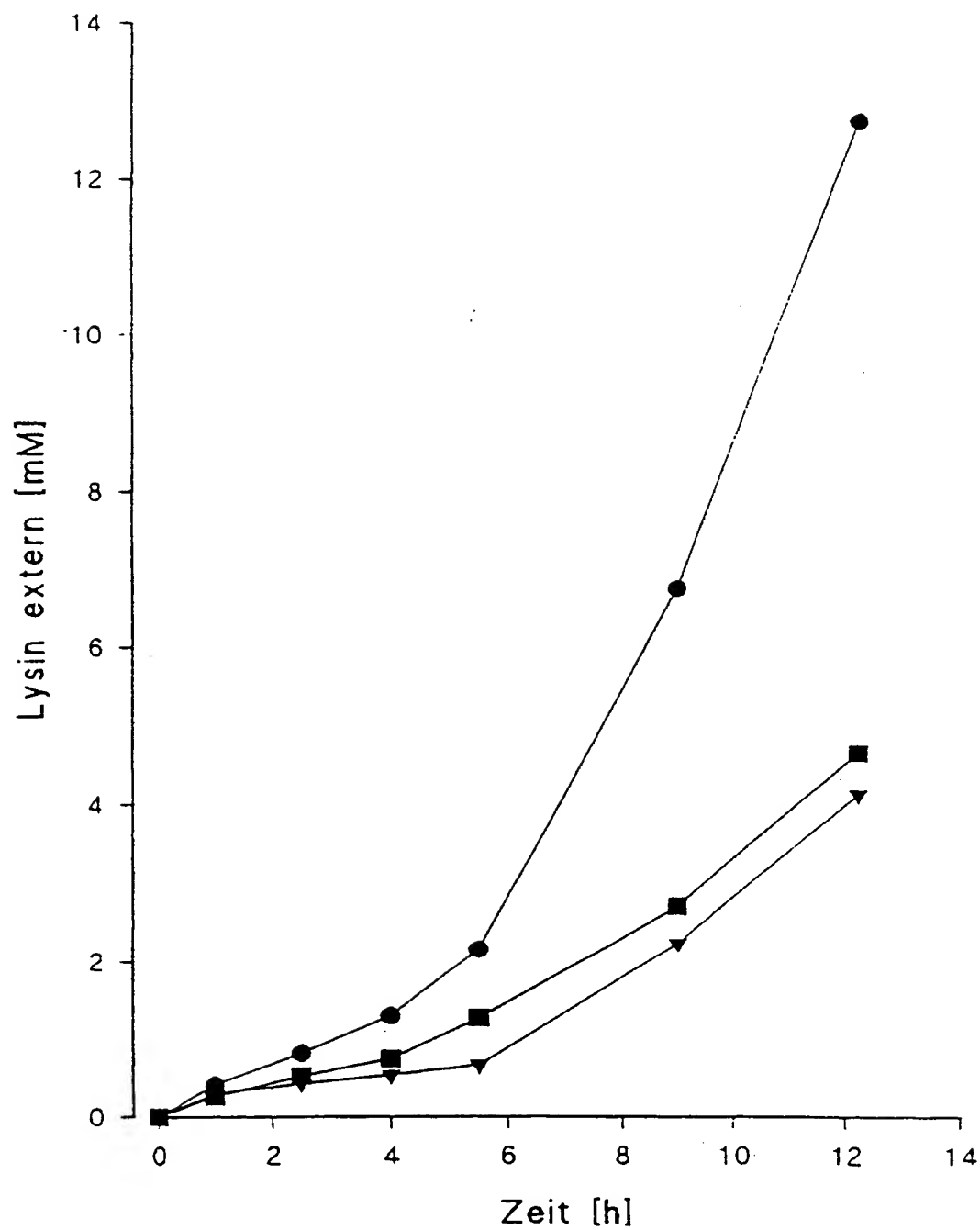
3/4

Komplementation d s Exportdefektes



Figur 3

4 / 4



Figur 4

ERSATZBLATT (REGEL 26)



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/31, C12P 13/08, C12N 1/21, C07K 14/34 // (C12N 1/21, C12R 1:15)</p>	A3	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/23597</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. Juli 1997 (03.07.97)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/02485</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 18. December 1996 (18.12.96)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 195 48 222.0 22. December 1995 (22.12.95) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Wilhelm-Johnen Strasse, D-52425 Jülich (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VRLIJC, Marina [DE/DE]; Steinstrasser Allee 60, D-52428 Jülich (DE). EGGELING, Lothar [DE/DE]; Elsenkamp 6, D-52428 Jülich (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D- 52428 Jülich (DE).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH; Rechts- und Patentabteilung, D-52425 Jülich (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, JP, KR, MX, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: 9. Oktober 1997 (09.10.97)</p>	
<p>(54) Title: PROCESS FOR THE MICROBIAL PRODUCTION OF AMINO ACIDS BY BOOSTED ACTIVITY OF EXPORT CARRIERS</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON AMINOSÄUREN DURCH GESTEIGERTE AK- TIVITÄT VON EXPORTCARRIERN</p>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;"> <p>LYSINE SECRETION Lysinsekretion</p> <p>pMV6-3 +</p> <p>pMV8-5-24 +</p> <p>pMV7-2 -</p> <p>pMV3-7 -</p> <p>pMV2-3 +</p> </div> <div style="margin-top: 20px;"> <p>2000 4000 6000 8000 10000</p> </div> </div>		
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention pertains to a process for the microbial production of amino acids. The process in question involves boosting the export carrier activity and/or export gene expression of a micro-organism which produces the desired amino acid. According to the invention, it was found that a single specific gene is responsible for the export of a given amino acid, and on that basis a process for the microbial production of amino acids, involving the controlled boosting of the export gene expression and/or export carrier activity of a micro-organism which produces the amino acid in question, has been developed for the first time. The boosted expression or activity of the export carrier resulting from this process increases the secretion rate and thus increases transport of the desired amino acid.</p>		

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren, bei dem die Exportcarrieraktivität und/oder die Exportgenexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Erfindungsgemäß wurde gefunden, daß für den Export von Aminosäuren jeweils nur ein einziges, spezifisches Gen verantwortlich ist, so daß erfindungsgemäß erstmals ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren zur Verfügung gestellt wird, bei dem gezielt die Exportgenexpression und/oder die Exportcarrieraktivität eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Die aus dieser Verfahrensweise resultierende, gesteigerte Expression bzw. Aktivität des Exportcarriers führt zu einer erhöhten Secretionsrate, so daß der Transport der entsprechenden Aminosäure erhöht ist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LX	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauritanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC1/DE 96/02485

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/31 C12P13/08 C12N1/21 C07K14/34 //(C12N1/21, C12R1:15)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	MOL MICROBIOL, DEC 1996, 22 (5) P815-26, ENGLAND, XP000675494 VRLJIC M ET AL: "A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from Corynebacterium glutamicum." see the whole document	1-48
X	JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 177, no. 20, October 1995, pages 5991-5993, XP000608713 WEHRMANN A ET AL: "FUNCTIONAL ANALYSIS OF SEQUENCES ADJACENT TO DAPE OF CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM REVEALS THE PRESENCE OF AROP, WHICH ENCODES THE AROMATIC AMINO ACID TRANSPORTER" see the whole document --- -/-	1-7,10, 21, 31-36, 41,43-48

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 August 1997

Date of mailing of the international search report

20.08.1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.

PCT/DE 96/02485

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 78, no. 6, 1994, pages 420-425, XP000608032 IKEDA M ET AL: "TRANSPORT OF AROMATIC AMINO ACIDS AND ITS INFLUENCE ON OVERPRODUCTION OF THE AMINO ACIDS IN CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM" see the whole document ---	1-7,10, 21, 31-36, 41,43-48
Y	J BACTERIOL, JUL 1995, 177 (14) P4021-7, UNITED STATES, XP000675335 VRLJIC M ET AL: "Unbalance of L-lysine flux in Corynebacterium glutamicum and its use for the isolation of excretion-defective mutants." see the whole document ---	1-7,10, 21, 31-36, 41,43-48
Y	WO 95 19442 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH ;MOECKEL BETTINA (DE); EGGELING LOTH) 20 July 1995 see claims 1-23 ---	1-7,10, 21, 31-36, 41,43-46
Y	EUR. J. BIOCHEM., vol. 202, 1991, pages 131-135, XP002037200 BROER S ET AL: "Lysine excretion by Corynebacterium glutamicum" see the whole document -----	1-7,10, 21, 31-36, 41,43-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

...ormation on patent family members

Internal Application No

PCT/DE 96/02485

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9519442 A	20-07-95	DE 4400926 C EP 0739417 A	01-06-95 30-10-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC1/DE 96/02485

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/31 C12P13/08 C12N1/21 C07K14/34 //(C12N1/21, C12R1:15)

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12P C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	MOL MICROBIOL, DEC 1996, 22 (5) P815-26, ENGLAND, XP000675494 VRLJIC M ET AL: "A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from Corynebacterium glutamicum." siehe das ganze Dokument	1-48
X	JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 177, Nr. 20, Oktober 1995, Seiten 5991-5993, XP000608713 WEHRMANN A ET AL: "FUNCTIONAL ANALYSIS OF SEQUENCES ADJACENT TO DAPE OF CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM REVEALS THE PRESENCE OF AROP, WHICH ENCODES THE AROMATIC AMINO ACID TRANSPORTER" siehe das ganze Dokument --- -/-	1-7,10, 21, 31-36, 41,43-48

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. August 1997

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

20.08.1997

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Espen, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/02485

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, Bd. 78, Nr. 6, 1994, Seiten 420-425, XP000608032 IKEDA M ET AL: "TRANSPORT OF AROMATIC AMINO ACIDS AND ITS INFLUENCE ON OVERPRODUCTION OF THE AMINO ACIDS IN CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM" siehe das ganze Dokument ---	1-7,10, 21, 31-36, 41,43-48
Y	J BACTERIOL, JUL 1995, 177 (14) P4021-7, UNITED STATES, XP000675335 VRLJIC M ET AL: "Unbalance of L-lysine flux in Corynebacterium glutamicum and its use for the isolation of excretion-defective mutants." siehe das ganze Dokument ---	1-7,10, 21, 31-36, 41,43-48
Y	WO 95 19442 A (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH ;MOECKEL BETTINA (DE); EGGELING LOTHAR) 20.Juli 1995 siehe Ansprüche 1-23 ---	1-7,10, 21, 31-36, 41,43-46
Y	EUR. J. BIOCHEM., Bd. 202, 1991, Seiten 131-135, XP002037200 BRÖER S ET AL: "Lysine excretion by Corynebacterium glutamicum" siehe das ganze Dokument -----	1-7,10, 21, 31-36, 41,43-46

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung..., die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/02485

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9519442 A	20-07-95	DE 4400926 C	01-06-95
		EP 0739417 A	30-10-96
